FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1920 — **THÈSE** — N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

PAR

Yvonne BÉNARD-RAYNEAU

Née à Nueil-sous-Passavant (Maine-et-Loire), le 7 janvier 1889

LA MÉTHODE ULTRA-PHOTOMÉTRIQUE

(NÉPHÉLÉMÉTRIQUE)

SON APPLICATION AU DOSAGE
DES PETITES QUANTITÉS D'ALBUMINE

Président : M. ROGER, *professeur*

PARIS
IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, rue Racine, 15

1920

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

LE DOYEN : M. ROGER
ASSESSEUR : G. POUCHET

PROFESSEURS

	MM
Anatomie	NICOLAS
Anatomie médico-chirurgicale	CUNEO
Physiologie	CH. RICHET
Physique médicale	BROCA (A.)
Chimie organique et Chimie générale	DESGREZ
Bactériologie	BEZANÇON
Parasitologie et Histoire naturelle médicale	BRUMPT
Pathologie et Thérapeutique générales	M. LABBÉ
Pathologie médicale	VAQUEZ
Pathologie chirurgicale	GOSSET
Anatomie pathologique	LETULLE
Histologie	PRENANT
Opérations et appareils	DUVAL
Pharmacologie et matière médicale	POUCHET
Thérapeutique	P. CARNOT
Hygiène	LÉON BERNARD
Médecine légale	BALTHAZARD
Histoire de la médecine et de la chirurgie	MENETRIER
Pathologie expérimentale et comparée	ROGER
Clinique médicale	ACHARD WIDAL GILBERT CHAUFFARD
Hygiène et clinique de la 1re enfance	MARFAN
Clinique des maladies des enfants	HUTINEL
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale	DUPRÉ
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	JEANSELME
Clinique des maladies du système nerveux	PIERRE MARIE
Clinique des maladies contagieuses	TEISSIER
Clinique chirurgicale	DELBET QUENU LEJARS HARTMANN
Clinique ophtalmologique	DE LAPERSONNE
Clinique des maladies des voies urinaires	LEGUEU
Clinique d'accouchements	BAR COUVELAIRE BRINDEAU
Clinique gynécologique	J.-L. FAURE
Clinique chirurgicale infantile	A. BROCA
Clinique thérapeutique	ALBERT ROBIN
Clinique oto-rhino-laryngologique	P. SEBILEAU

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.			
ALGLAVE	GUILLAIN	LOEPER	ROUSSY
BRANCA	LABBE (H.)	MOCQUOT	ROUVIERE
CAMUS	LAIGNEL-LAVASTINE	MULON	SCHWARTZ(A.)
CASTAIGNE	LANGLOIS	NOBECOURT	SICARD
CHAMPY	LECENE	OKINCZYC	TANON
CHEVASSU	LEMIERRE	OMBREDANNE	TERRIEN
DESMAREST	LENORMANT	RATHERY	TIFFENEAU
GOUGEROT	LEQUEUX	RETTERER	VILLARET
GREGOIRE	LEREBOULLET	RIBIERRE	ZIMMERN
GUENIOT	LERI	RICHAUD	

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'École a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A TOUS LES MIENS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur ROGER

Membre de l'Académie de Médecine
Doyen de la Faculté de Médecine
Médecin de l'Hôtel-Dieu

A MES AUTRES MAITRES A LA FACULTÉ
ET DANS LES HOPITAUX DE PARIS

Monsieur le Professeur GILBERT
Membre de l'Académie de Médecine

Monsieur le Professeur ACHARD
Membre de l'Académie de Médecine

Monsieur le Professeur MÉNÉTRIER
Membre de l'Académie de Médecine
Médecin de l'Hôtel-Dieu

Monsieur le Docteur POTHERAT
Chirurgien de l'Hôtel-Dieu

Monsieur le Docteur LEREBOULLET
Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine
Médecin à l'Hôpital Laënnec

Monsieur le Docteur VILLARET
Professeur agrégé à la Faculté de Médecine
Médecin des Hôpitaux

Monsieur le Docteur BAUDOUIN
Professeur agrégé à la Faculté de Médecine
Médecin des Hôpitaux

A MES MAITRES A L'ÉCOLE DE MÉDECINE DE NANTES

Monsieur le Docteur MIRALLIÉ
Directeur de l'École de Médecine
Professeur de Pathologie Interne

Monsieur le Docteur GUILLEMET
Professeur de Clinique Obstétricale

Monsieur le Docteur OLLIVE
Professeur de Clinique Médicale
Membre de l'Académie de Médecine

Monsieur le Docteur VIGNARD
Professeur de Clinique Chirurgicale

LA

MÉTHODE ULTRA-PHOTOMÉTRIQUE

(NÉPHÉLÉMÉTRIQUE)

SON APPLICATION AU DOSAGE DES PETITES QUANTITÉS D'ALBUMINE

INTRODUCTION

Un grand nombre de méthodes de dosage utilisées en biologie font appel à des réactions de précipitation. Le précipité obtenu dans des conditions de milieu bien déterminées peut être recueilli, soit par filtration, soit par centrifugation, puis lavé, desséché et évalué, en dernier lieu, à la balance.

Cette méthode dite *méthode pondérale* comporte une précision très grande. Malheureusement, elle est d'une technique souvent longue et délicate, et, d'autre part, elle nécessite presque toujours des quantités assez considérables de la substance à doser, toutes conditions qui en restreignent nécessairement l'emploi.

Aussi, dans bien des cas, préfère-t-on une méthode moins précise, mais, plus rapide et plus simple, et,

surtout applicable à de petites quantités de matières, les seules dont on dispose souvent dans bon nombre de recherches cliniques ou expérimentales.

Dans le domaine des réactions de précipitation, plusieurs de ces méthodes simples peuvent être utilisées.

Une des plus répandues consiste à laisser reposer dans un tube gradué le milieu au sein duquel on a produit le précipité. Celui-ci s'accumule de lui-même au fond du tube, y occupe une hauteur variable, et, c'est précisément cette hauteur, observée au bout d'un temps bien déterminé, qui sert de mesure à l'abondance du précipité. Le type de cette *méthode de sédimentation* est le dosage de l'albumine urinaire par le procédé d'Esbach, journellement employé en clinique. Une méthode de même genre a été appliquée dernièrement avec de bons résultats par MM. Sicard et Cantaloube (1) au dosage de l'albumine du liquide céphalo-rachidien.

Les méthodes de sédimentation donnent en général leur réponse avec un retard de vingt-quatre heures. On peut évaluer plus rapidement l'abondance d'un précipité, par voie optique, en mesurant l'opacité du milieu où il a pris naissance.

Plusieurs appareils simples ont été imaginés dans ce dernier but. Les uns placent l'émulsion dans un tube que l'on compare à une série de tubes-étalons

1. Sicard et Cantaloube, Rachialbuminimètre (*Bull. Soc. Med. Hôp.*, 31 mars 1916).

examinés dans les mêmes conditions d'éclairage. Les autres donnent l'épaisseur sous laquelle il devient impossible de lire par transparence certains caractères graphiques de dimension déterminée.

D'une façon plus précise, on peut placer la suspension du précipité dans le godet d'un colorimètre Duboscq et la comparer à une émulsion type obtenue dans des conditions semblables et placée dans le godet opposé.

Dans les méthodes précédentes, le trouble apporté par le précipité est évalué *par transparence*, ou, comme on dit encore : *par diaphanoscopie*.

On conçoit que le procédé devienne inapplicable pour les précipités très peu denses, pour ceux qui se réduisent à une simple *louche*, car, à moins d'opérer sous des épaisseurs considérables, la lumière *absorbée* devient alors négligeable par rapport à la lumière *transmise*.

On tourne la difficulté en observant le « louche », non plus par transparence, mais, par *éclairage latéral sur fond noir*. Ici, ce n'est plus l'absorption de la lumière transmise qui sert de mesure à l'abondance du précipité, mais, *la quantité de lumière diffusée*, et, plus le louche est accentué, plus cette dernière est grande et, plus le tube apparaît éclairé.

Cette méthode dont l'emploi tend à se répandre de plus en plus, porte le nom de *néphélémétrie* ou mieux d'*ultra-photométrie* (Baudoin et H. Bénard), ce dernier terme ayant l'avantage de souligner l'analogie avec l'ultra-microscopie.

C'est elle qui fera l'objet de ces quelques pages, et, nous verrons, en particulier, l'application qu'on peut en faire au dosage des solutions faibles d'albumine.

HISTORIQUE

C'est une notion courante que, pour examiner dans de bonnes conditions un léger précipité que l'on vient de produire dans un tube, il faut regarder ce tube, non directement en pleine lumière, mais, le placer sur un fond noir, l'éclairage venant seulement de côté. C'est de cette façon qu'on apprécie journellement les plus légers louches que l'action de la chaleur produit dans une urine albumineuse.

Dans le dosage de l'albumine du liquide céphalo-rachidien, l'échelle de M. Marcel Bloch (1), le tube néphéloscopique de MM. Ravaut et L. Boyer (2) s'examinent également à la lumière indirecte.

L'éclairage latéral sur fonds noir représente comme on sait le principe fondamental de l'*ultra-microscope*. Mais, l'idée d'adapter le même principe au dispositif bien connu du colorimètre est de date relativement récente.

Une des premières tentatives de ce genre est due

1. Marcel Bloch, *Dosage rapide de l'albumine du liquide céphalo-rachidien. Echelle albuminimétrique* (Soc. neur., 6 nov. 1913).

2. Ravaut et L. Boyer, *Nouveau procédé de dosage rapide de l'albumine dans le liquide céphalo-rachidien* (*Presse Méd.*, 17 janv. 1920).

à Richards et Wells (1). Deux tubes renfermant les émulsions à comparer sont disposés obliquement sur une planchette. Un dispositif à glissière permet

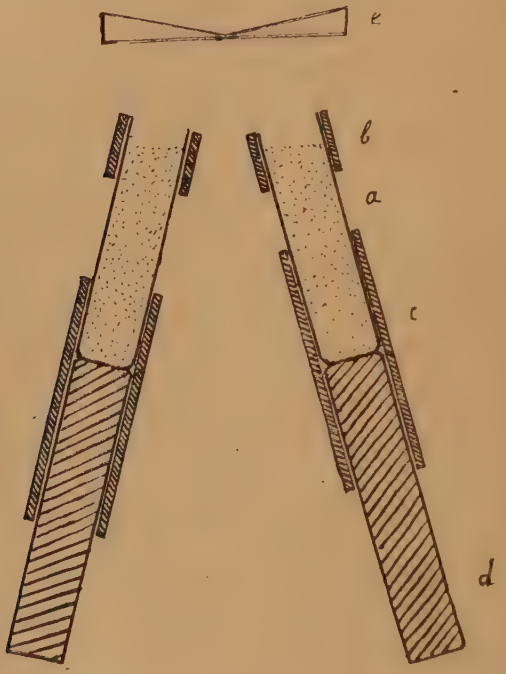


Fig. 1. — Schéma de l'appareil de Richards et Wells.

a) tube de verre renfermant la suspension colloïdale.

b) manchon opaque fixe masquant l'extrémité supérieure du tube de verre.

c) manchon opaque mobile découvrant plus ou moins le tube de verre *a*.

d) colonne fixe servant de support au tube de verre *a* et guidant le manchon mobile *c* dans ses déplacements.

e) système optique ramenant au contact les sections des deux tubes.

de découvrir sur chacun d'eux une longueur mesurable, le reste des tubes demeurant caché à la lumière. Les tubes sont examinés suivant leur axe, un prisme particulier ramène leur section au contact.

1. Richards et Wells, *Americ. Chem. Journ.*, 31-205, 1904.

Dans les quelques années qui ont précédé la guerre, plusieurs laboratoires ont construit ou fait construire des dispositifs plus ou moins analogues pouvant s'adapter sur les colorimètres usuels.

C'est ainsi qu'en 1914, MM. Villaret et Henri Bénard ont fait établir par la maison Pellin un dispositif néphélémétrique pouvant se monter sur le colorimètre de 10 centimètres fabriqué par la même maison.

Deux ans auparavant, Kober (1) avait fait construire un coloro-néphélémètre qui a déjà servi à un très grand nombre de recherches effectuées à l'étranger (2).

Tout dernièrement, Kleinmann a obtenu de bons résultats dans le dosage des phosphates avec un néphélémètre construit par Schmidt et Haensch (3).

En même temps, MM. Baudouin et H. Bénard (4) mettaient au point un colorimètre de dimensions réduites pouvant également servir d'ultra-photomètre et dont nous donnerons plus loin la description.

1. Kober, *Journ. Biol. Chem.*, 13-485, 1912.

2. Folin et Denis, *Aceton. aceto-acetic. aceid. and β-oxybutiric acid.* (*Journ. Biol. Chem.*, 1914, *18*-263); Pfeiffer, Kober, Field, *Proceedings soc. for experiment. biol. and med.*, 1915, *12*-133; Bloor, *Fats in the Blood* (*Journ. Biol. Chem.*, 1914, *17*-377); Bloor, *Luithin in the Blood* (*Journ. Biol. Chem.*, 1916, *24*-450).

3. Kleinmann, *Algemeine Principien der Nephelemetrie und Construction eines neuen Nephelemetus* (*Bioch. Zeitsch.*, 99-1919).

4. Baudouin et H. Bénard, *Un nouvel instrument* (micro-colorimètre et néphelémètre (C. R. Soc. Biol., 1er mai 1920).

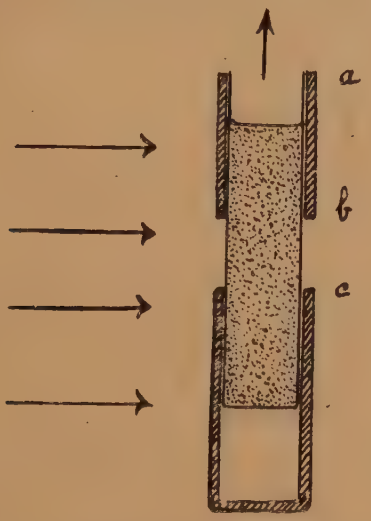
PRINCIPE DE LA MÉTHODE ULTRA-PHOTOMÉTRIQUE

Soit un tube de verre A placé verticalement et renfermant un liquide à peine louche tel qu'une suspension colloïdale. Supposons que le tube ait été recouvert d'un manchon opaque, fixe de *a* jusqu'à *b*, et d'un manchon opaque mobile à partir de *c*. Eclairons le tube par un faisceau de rayons parallèles de direction perpendiculaire au tube, et, examinons celui-ci par le haut, suivant son axe ; la lumière rencontrant les petites particules de la solution colloïdale, diffuse dans toutes les directions, en particulier suivant l'axe, si bien que la lumière du tube apparaît éclairée.

On conçoit que, plus le nombre des particules sera considérable — c'est-à-dire, plus la solution sera louche — plus la quantité de lumière diffusée sera grande, et plus le tube paraîtra éclairé.

De même, si, pour une émulsion donnée, on abaisse le manchon mobile, la nouvelle tranche découverte diffuse une nouvelle quantité de lumière qui s'ajoute suivant l'axe du tube à la première, et la clarté de ce dernier s'en trouve augmentée d'autant.

La calcul et l'expérience montrent que, pour des émulsions *très légères* et *formées de grains égaux*, la quantité de lumière diffusée est proportionnelle, d'une part, à la « densité » de l'émulsion, c'est-à-dire au nombre de grains par centimètre cube, et, d'autre part, à la hauteur de la partie découverte sur le tube.



Dès lors, supposons deux tubes A et B, placés côte à côte, éclairés de la même façon et renfermant deux émulsions de même nature mais de densités différentes : Si le tube A étant découvert d'une hauteur a, il faut, pour avoir égalité d'éclairage, découvrir le tube B d'une hauteur b, les richesses des deux émulsions sont dans le rapport inverse des hauteurs découvertes, et l'on a, en appelant x la densité (1) de l'émulsion du tube B et D celle de l'émulsion du tube A.

$$x = D\frac{a}{b}.$$

1. Nombre de grains par centimètre cube.

RÉALISATION PRATIQUE DES DISPOSITIFS ULTRA-PHOTOMÉTRIQUES ADAPTABLES AU COLORIMÈTRE

Plusieurs dispositifs peuvent être adaptés aux colorimètres permettant d'effectuer avec ceux-ci des mesures ultra-photométriques.

Le dispositif de MM. Villaret et Henri Bénard construit par la maison Pellin, d'abord pour le colorimètre de 10 centimètres, puis pour le colorimètre de 5 centimètres, est la réalisation à peu près exacte du schéma que nous avons décrit dans le chapitre précédent.

Voici les caractéristiques du modèle correspondant au colorimètre de 10 centimètres.

Un tube de verre de 16 millimètres de diamètre et de 18 centimètres de longueur est mastiqué dans un manchon métallique de 3 centimètres de long qu'on visse en place d'un des plongeurs. Le chariot mobile de l'appareil porte un second manchon métallique fermé à son orifice inférieur et dans lequel s'engage par son autre orifice l'extrémité inférieure du tube de verre. L'appareil marque zéro lorsque les deux manchons métalliques, le fixe et le mobile sont en con-

tact. Le tube de verre est alors complètement masqué à la lumière. On le découvre en abaissant le chariot mobile d'une longueur lue directement sur la graduation du colorimètre. Afin d'éviter les réflexions nuisibles, le tube reste encore engagé de 5 centimètres lorsque le chariot est au bas de sa course. D'autre part, le tube est rempli presque jusqu'en haut par le liquide à mesurer, de telle façon que le ménisque soit à 1 centimètre environ au-dessus de l'extrémité inférieure du manchon fixe.

L'appareil est, naturellement symétrique, un des tubes renfermant une solution étalon. Il donne des résultats très bons, mais, il faut à chaque mesure dévisser et revisser les tubes pour changer les liquides ce qui constitue une petite complication.

Dans le dispositif adopté par Kober, le plongeur du colorimètre est constitué par un tube creux de verre noir à l'extrémité inférieure duquel est fixé un disque à faces parallèles de verre blanc.

Pour transformer l'appareil en néphélémètre, il suffit de remplacer les godets ordinaires par des godets en verre transparent dans le fond est constitué par un disque noir complètement opaque. L'appareil est d'un maniement très simple, mais les quantités de lumière réfléchie aux surfaces extrêmes et se mélangeant à la lumière diffusée, sont loin d'être négligeables. On en tient compte en étalonnant l'appareil, mais, sa sensibilité s'en trouve d'autant diminuée.

Tout dernièrement, MM. Baudouin et H. Bénard (1) ont fait établir par la maison Pellin un dispositif ultra-photométrique d'un maniement simple et s'adaptant sur un colorimètre de dimensions réduites dont voici avec quelques détails, les caractéristiques principales.

Il s'agit d'un colorimètre de 2 centimètres de course

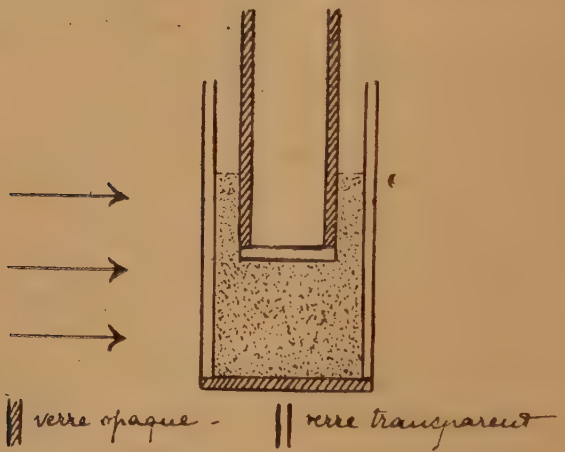


Fig. 3. — Schéma du dispositif de Kober.

utile. Les plongeurs sont entièrement en verre formés de baguettes pleine en crown de 6 millimètres de diamètre. Les godets sont également en verre ; leur partie supérieure est munie d'une sorte d'évasement dans lequel peuvent s'accumuler les liquides lorsque l'appareil est au zéro. La contenance de la partie cylindrique des godets est d'environ 1 centimètre cube pour une hauteur de 20 millimètres.

1. A. Beaudouin et Henri Bénard, *Un nouvel instrument (microcolorimètre et néphélémètre)*. C. R. Soc. Biol., 1er mai 1920.

Pour se servir de l'appareil comme ultra-photomètre, on dévisse les plongeurs et on les remplace chacun par un manchon métallique creux de 21 millimètres de diamètre et de 15 millimètres de haut. Ce manchon porte intérieurement trois petits ressorts

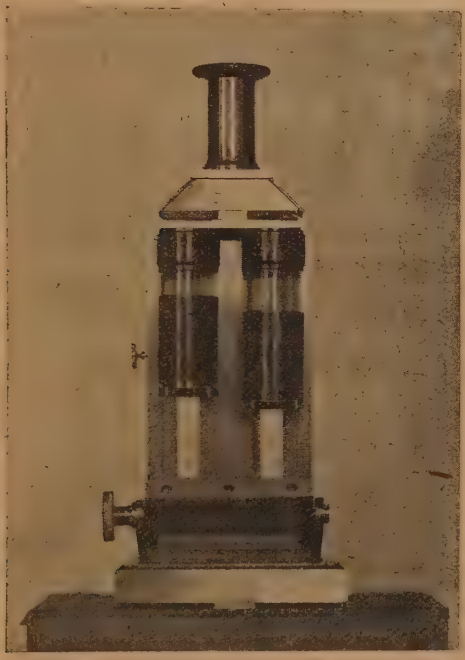


Fig. 4. — Appareil de MM. Beaudouin et H. Bénard monté comme ultra-photomètre. Le miroir n'est ici d'aucune utilité.

et peut ainsi recevoir et garder par frottement l'extrémité supérieure d'une petite éprouvette de verre à fond plat. L'extrémité inférieure de cette éprouvette déborde le manchon d'environ 3 centimètres et s'engage sans frottement dans un autre manchon métallique haut de 30 millimètres. Ce nouveau manchon,

fermé à son extrémité inférieure, repose sur le chariot mobile de l'appareil en place du godet habituel. Au zéro, les deux pièces métalliques, supérieure et inférieure, sont en contact et l'éprouvrette de verre est ainsi complètement masquée à la lumière. Lorsqu'on abaisse le chariot mobile, la pièce inférieure descend seule et découvre ainsi l'éprouvette sur une longueur donnée directement par la graduation de l'instrument.

L'avantage du dispositif précédent est de permettre de pratiquer des mesures néphélémétriques sur de petites quantités de liquide (10 cmc.) (1) tout en laissant à l'éprouvette de verre un diamètre suffisant pour éliminer les perturbations apportées par le ménisque supérieur. Avec un diamètre de 2 centimètres, en effet, la partie centrale du ménisque est suffisamment plane pour qu'on puisse se dispenser de munir la pièce métallique supérieure d'un petit plongeur de verre. On supprime ainsi bien des manœuvres de nettoyage lors de mesures portant sur des liquides différents.

1. Ces 10 centimètres cubes correspondent en réalité à une très faible quantité de la substance en suspension.

TECHNIQUE D'UNE MESURE

Eclairage

Une condition essentielle pour pratiquer de bonnes mesures ultra-photométriques est de disposer d'un éclairage puissant, uniforme, et composé de rayons aussi parallèles que possible. On obtient à ce point de vue de très bons résultats en faisant usage d'une lanterne, dite d'agrandissement, munie d'un condensateur de 15 centimètres au foyer duquel se trouve une lampe électrique de 200 bougies à filament métallique ramassé sur lui-même. La planchette porte-objectif de cette lanterne est remplacée par une planchette en bois percée d'une ouverture rectangulaire de 8 centimètres de large sur 4 centimètres de haut. Cette planchette sert de diaphragme et arrête les rayons parasites. En la maintenant très près du condensateur et en plaçant l'ultra-photomètre presque à son contact, on obtient un éclairage uniforme sur toute la hauteur de course utile de l'appareil.

Réglage

On se place dans une pièce obscure ou dans une partie sombre d'une pièce ordinaire. L'ultra-photo-

mètre est posé sur un cube de bois qui le maintient à hauteur convenable au contact de la planchette-diaphragme de la lanterne. Un repère en équerre fixé sur le cube de bois permet de centrer très rapidement l'appareil sur l'axe optique de la lanterne.

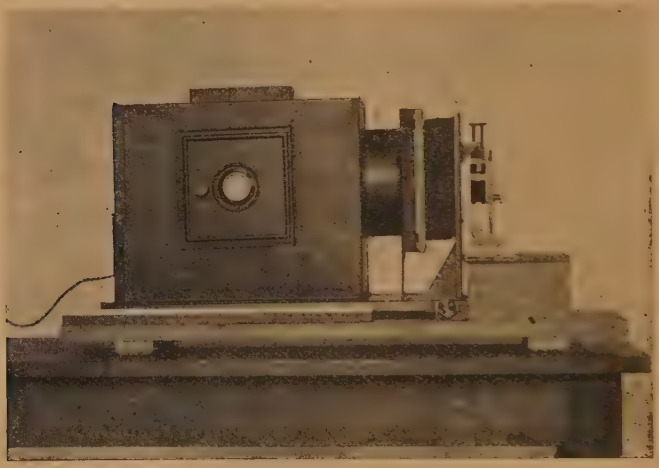


Fig. 5. — Vue d'ensemble de l'appareil.

On remplit également les deux éprouvettes du néphélémètre avec une même solution faible colloïdale, solution de glycogène à 1/1.000. Dans chaque éprouvette ainsi remplie on fait tomber un disque de verre noir dépoli qui vient se loger à plat au fond. Les deux éprouvettes sont alors mises en place, découvertes chacune de 10 millimètres bien exactement, et l'on observe par la lunette de l'instrument.

Si le réglage est correct, les deux plages doivent apparaître également éclairées. Sinon, on déplace doucement la lampe à l'intérieur de la lanterne, soit

vers la droite, soit vers la gauche, jusqu'à ce que l'égalité des deux plages soit obtenue.

On vérifie que le résultat est bon en manœuvrant l'un des chariots mobiles, l'autre restant à la position 10. La moyenne des lectures correspondant à l'égalité des deux plages doit redonner le chiffre 10.

Les mesures ultra-photométriques doivent être effectuées sur des précipités ou des suspensions colloïdales extrêmement dilués donnant à peine un trouble appréciable à la lumière transmise (1).

Dans ces conditions, les déterminations comportent une précision très grande. En opérant sur une même suspension colloïdale placée symétriquement dans les deux éprouvettes de l'appareil, on obtient l'égalité d'éclairage pour des hauteurs découvertes ne différant pas de 1/50.

1. Dans le cas contraire, en effet, la lumière diffusée par les couches inférieures subit une absorption notable en traversant les couches supérieures, ce qui complique beaucoup les lois de la diffusion.

APPLICATION DE LA MÉTHODE ULTRA-PHOTOMÉTRIQUE AU DOSAGE DES SUSPENSIONS COLLOÏDALES

Conditions nécessaires

La théorie de lord Rayleigh et l'expérience montrent que la quantité de lumière diffusée par un volume déterminé d'une suspension colloïdale est fonction, non seulement du *nombre*, mais de la *dimension* des grains de cette suspension.

Dès lors, deux conditions sont nécessaires pour que la méthode ultra-photométrique puisse être appliquée au dosage quantitatif d'une substance amenée à l'état de précipité colloïdal :

1° Il faut que la précipitation soit totale ou du moins que la masse des grains soit très grande par rapport à la quantité de substance restée en *solution* dans le liquide intermicellaire.

2° Il faut que d'une *précipitation à l'autre*, on retombe toujours sur des grains de *même dimension*, autrement dit qu'on puisse régler les conditions de la précipitation d'une façon telle qu'on obtienne toujours des grains de même grosseur, caractéristiques du précipité à doser.

La première condition se trouve, en général, facilement réalisée. Pour un très grand nombre de substances, en effet, on peut obtenir une précipitation totale ou pratiquement totale, le précipité étant à peu près insoluble dans un excès du liquide qui le tient en suspension.

D'ailleurs, alors même que cette première condition ne se trouverait pas parfaitement réalisée, il serait facile d'en tenir compte par un étalonnage préalable, permettant de corriger les résultats obtenus directement.

Reste la seconde condition. Est-on sûr, même en opérant d'une façon aussi méthodique que possible, d'obtenir, pour une substance déterminée, des précipités toujours comparables à eux-mêmes, c'est-à-dire identiques en ce qui concerne la dimension des grains ?

Ici réside le point faible de la méthode ultra-photométrique.

L'expérience montre, en effet, qu'au point de vue de la *fixité du grain*, les diverses substances précipitables à l'état colloïdal n'offrent pas toutes les mêmes garanties :

Pour certaines, l'identité des grains ne peut être obtenue, à coup sûr, d'une expérience à l'autre, *même en se plaçant dans des conditions aussi uniformes que possible* de température et de vitesse de mélange des solutions.

Pour d'autres, au contraire, il existe une très grande fixité dans la grosseur du grain. Ainsi que

nous allons le voir, c'est le cas de certains précipités albumineux qui se prêtent par conséquent fort bien à des déterminations quantitatives par la méthode ultra-photométrique.

Application au dosage des solutions faibles d'albumine

Dans le but de préciser la valeur de la méthode ultra-photométrique dans le dosage des solutions peu concentrées d'albumine, nous avons procédé à un certain nombre d'expériences qui ont portés sur des solutions obtenues artificiellement en diluant du sérum de cheval (serum anti-dysentérique) dans de l'eau chlorurée physiologique. Les dilutions étaient faites de façon à ramener la teneur en albumine à un taux de l'ordre du gramme par litre.

Après plusieurs essais, nous avons adopté comme agent de précipitation l'acide trichloracétique au 1/5 qu'on fait tomber *brusquement* à la température ordinaire et *en grand excès*, à raison de vingt volumes, dans la solution albumineuse.

On obtient ainsi une précipitation à peu près totale. D'autre part, dans les conditions ainsi réalisées, le précipité est formé de grains assez fins et assez distants les uns des autres pour que la suspension reste stable un temps suffisamment long et ne montre que peu de tendance à la « floculation ».

Enfin, étant donné le grand excès du liquide précipitant, la composition du milieu intermicellaire

reste à peu près constante, à peine modifiée par les variations de constitution de la solution albumineuse et dès lors, il y a tout lieu de supposer que les grains d'albumine formés d'une expérience à l'autre, à la même vitesse de mélange des solutions, sont identiques ou tout au moins très comparables entre eux.

Le tableau suivant montre que les résultats sont conformes aux prévisions. Des solutions de sérum de cheval dilué cent fois, cent cinquante fois et deux cent cinquante fois dans de l'eau chlorurée à 7 o/oo sontprécipitées à raisonde o cmc.5 de la dilution pour 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique au 1/5 et comparées entre elles.

Liquide I	Sérum anti-dysentérique.....	1
	Eau chlorurée à 7 o/oo q. s.....	100
Liquide II	Sérum anti-dysentérique.....	1
	Eau chlorurée à 7 o/oo q. s.....	150
Liquide III	Sérum anti-dysentérique.....	1
	Eau chlorurée à 7 o/oo q. s.....	250

1° On précipite $0^{cc}5$ du liquide III par 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique à 1/5 (Louche A).

On refait la même opération avec une nouvelle prise de $0,^{c}5$ du liquide III (Louche B).

Les deux louches sont comparés à l'ultra-photomètre.

Le louche A est découvert sur une hauteur de 10^{mm}.

L'égalité d'éclairage est obtenu en découvrant le louche B de

10^{mm}

9 , 7

9 , 8

10 , 1

9 , 9

Moyenne..... 9 , 9 au lieude 10, chiffre théorique.

Erreur..... 1/100.

2° On précipite $0^{c},5$ du liquide III par 10 centimètres cubes d'acide trichloractique à 1,5 (Louche A'). On compare le louche A' à l'ancien louche A, vieux d'une demi-heure.

Le louche A est découvert sur une hauteur de 15^{mm}.

On obtient l'égalité d'éclairage en découvrant A, de

$15^{mm}2$
15 , 3
15 , 2
15 , 4

Moyenne ... 15 , 27 au lieu de 15, chiffre théorique
Erreur ..... 2/100.

3° On précipite $0^{c},5$ du liquide III par 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique à 1/5 (Louche C).

On précipite de même $0^{c}5$ du liquide II (Louche D).

On compare C et D.

Le louche C est découvert sur 15 millimètres.

L'égalité d'éclairage est obtenu en découvrant le louche D de

$9^{mm}2$
9 , 2
9 , 1
9 , 1

Moyenne ..... 9 , 15 au lieu de 9, chiffre théorique
Erreur ..... 1,5/100.

4° On précipite $0^{c},5$ du liquide II par 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique à 1/5 (Louche E).

On précipite de même $0^{c}5$ du liquide I (Louche F).

On découvre E de 15 millimètres.

L'égalité d'éclairage est obtenu en découvrant F de

$10^{mm}1$
10 , 3
10 , 3
10 , 2

Moyenne ... 10 , 25 au lieu de 10, chiffre théorique.
Erreur ..... 2,5/100.

5° On précipite 0°, 5 du liquide I par 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique à 1/5 (Louche G).

On compare G à l'ancien louche A, vieux d'environ deux heures.

On découvre A de 20 millimètres.

L'égalité d'éclairage est obtenu en découvrant le louche G de

	$7^{mm}9$
	8 , 1
	8 , 1
	8 , 0
Moyenne	8 , 025 au lieu de 8, chiffre théorique
Erreur.....	0,30/100.

Comme on le voit, les indications néphélémétriques sont à 1/40 près, inversement proportionnelles à la concentration des solutions albumineuses.

La méthode ultra-photométrique peut donc être appliquée avec de sérieuses garanties au dosage des solutions faibles d'albumine.

Pratiquement, on procédera de la façon suivante :

Dans une des éprouvettes de l'appareil, on introduit 0 cmc. 5 de liquide céphalo-rachidien bien exactement mesuré à l'aide d'une pipette de Levaditi.

Dans l'autre éprouvette on introduit 0cmc. 5 d'une solution albumineuse de titre connu (voir plus loin).

De part et d'autre, on verse brusquement avec une pipette graduée, 10 centimètres cubes d'acide trichloracétique au 1/5. On mélange en retournant deux ou trois fois chacun des tubes bouché avec le doigt; on y fait tomber les petits disques noirs et l'on adapte chacune des éprouvettes sur l'appareil ; celui-

ci est alors mis lui-même en position convenable au-devant de la planchette diaphragme de la lanterne.

La solution à mesurer est découverte sur une hauteur de 10 millimètres et l'on manœuvre la vis de l'autre chariot mobile jusqu'à ce que l'on obtienne l'égalité d'éclairage des deux plages aperçues par la lunette. On fait trois mesures et l'on prend la moyenne. Soit N le nombre de divisions correspondant à l'égalité, A le titre de la solution-étalon (c'est-à-dire le nombre de grammes d'albumine par litre), la quantité x d'albumine à doser est donnée elle-même en grammes par litre par la relation.

$$x = \frac{N}{10} A.$$

Solution-étalon. — La méthode précédente exige comme élément de comparaison une solution-étalon. Celle-ci peut être obtenue à l'aide d'un sérum de cheval dont on a déterminé la teneur en albumine par pesée ou par réfractométrie et qu'on a ramené au taux de 50 grammes par litre par adjonction d'une quantité convenable d'eau chlorurée à 5 pour 1000. Recouverte de toluène, cette solution-mère peut servir très longtemps. Au moment de l'emploi, on la dilue cent fois dans de l'eau chlorurée ce qui la ramène au taux de 0 gr. 50 par litre. C'est cette dilution qui servira d'étalon et qu'on traitera de la même façon que la solution à mesurer.

En opérant comme il vient d'être dit, le dosage d'une solution albumineuse de l'ordre du gramme

par litre peut être fait avec une erreur ne dépassant pas 2,5 o/o.

La méthode ultra-photométrique paraît donc pouvoir rendre de grands services dans l'évaluation quantitative de l'albumine du liquide céphalo-rachidien dont le taux oscille à l'état normal autour de 0 gr. 25 par litre.

Toutefois, il convient de remarquer que les résultats que nous avons obtenus l'ont été avec une albumine toujours identique à elle-même (sérum de cheval) et comparée un étalon de même nature.

Aussi n'est-on pas en droit d'affirmer d'emblée que la méthode est applicable *avec la même précision* aux albumines plus complexes du liquide céphalo-rachidien.

Dans des recherches actuellement en cours, nous nous proposons de vérifier :

1° Si les résultats obtenus avec un même liquide céphalo-rachidien diversement dilué, sont, comme la théorie le veut, dans le rapport des dilutions;

2° Si les résultats obtenus avec des liquides céphalo-rachidiens différents concordent avec les déterminations obtenues par pesée ou par dosage de l'azote total.

Enfin, nous nous proposons également de rechercher un étalon de comparaison qui soit d'une conservation plus facile qu'une solution albumineuse titrée.

CONCLUSIONS

La méthode *néphélémétrique*, ou, plus exactement, *ultra-photométrique*, se présente comme la méthode de choix dans le dosage des petites quantités de substances mises à l'état de suspensions colloïdales très diluées.

Elle consiste à examiner la suspension colloïdale, non directement à la lumière transmise, mais, indirectement *à la lumière diffusée par éclairage latéral sur fond noir*.

L'adaptation d'un dispositif d'éclairage latéral sur fond noir à un colorimètre du genre Dubosq donne à cette méthode une très grande précision.

Elle peut être appliquée avec de très bons résultats au dosage d'une solution faible d'albumine, en précipitant celle-ci par un grand excès d'acide trichloracétique et en la comparant à une solution titrée d'albumine de même nature, traitée de la même façon.

Il y a lieu de supposer qu'elle pourra constituer une excellente méthode de dosage de l'albumine du liquide céphalo-rachidien.

Vu : le Président de la thèse,
ROGER

Vu le Doyen
ROGER

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
P. APPELL

Imp. de la Faculté de Médecine, 15, rue Racine. Paris — 4710-20

494

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE